新型 *R*-扁桃酸脱氢酶的基因挖掘及表达鉴定*

唐存多 [1,2§] 史红玲 [1§] 马越 [1] 丁朋举 [1] 许建和 [2**] 阚云超 [1**] 姚伦广 [1**]

（1 南阳师范学院昆虫生物反应器河南省工程实验室和河南省南水北调中线水源区生态安全重点实验室 南阳 473061）（2 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237）

摘 要: R-扁桃酸脱氢酶在苯乙酮酸的生物合成中起着关键的作用，挖掘具有高催化活性及稳定性的新型 R-扁桃酸脱氢酶具有重要的意义。为了获得理想的 R-扁桃酸脱氢酶，本研究采用基因组挖矿技术从 *Lactobacillus harbinensis* 菌株中获得了一个新型的 R-扁桃酸脱氢酶 LhDMDH，重组 LhDMDH 的比酶活高达 1264.3 U/mg，约为探针的 4 倍，在已报道的 R-扁桃酸脱氢酶中处于领先水平。同时，考察了 4 个重组酶主要的酶学特性，它们的最适反应温度在 25~30℃，最适反应 pH 在 9.0~9.5。动力学参数的结果表明，LhDMDH 对底物的 K_{cat} 值为 30.28 S^{-1}，明显高于其它重组酶。此外，底物谱分析的结果也表明 LhDMDH 在外消旋扁桃酸的手性拆分及苯乙酮酸的生物合成中更具优势。本研究在 R-扁桃酸脱氢酶基因挖掘方面取得了较为理想的结果，为进一步的改造及应用奠定了坚实的基础，也为其它酶的挖掘提供了可资借鉴的经验。

关键词: 扁桃酸脱氢酶 基因组挖矿 表达 酶学特性 生物催化

苯乙酮酸(Phenylglyoxylic acid, PGA)又名苯甲酰甲酸，属于α-酮酸类化合物，是一种重要的合成砌块，以苯乙酮酸为原料可以合成多种重要的医药中间体[1, 2]。由于苯乙酮酸容易氧化、脱羧和脱羰，因而它的合成较为困难，已报道的合成方法主要有苯甲酰腈水解法、苯乙烯氧化法、扁桃酸氧化法、傅克酰化法和生物催化合成法[3]，其中扁桃酸脱氢酶在苯乙酮酸的生物合成中起着重要的作用[4]。扁桃酸脱氢酶广泛存在于能够代谢扁桃酸的微生物中，而来自于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)和牧草红酵母(*Rhodotorula graminis*)的扁桃酸脱氢酶研究得最为详尽和透彻[5]，前者作用于 S-扁桃酸，而后者作用于

投稿日期：2017-10-24，修回日期：2017-11-28

*河南省科技攻关项目(162102210116)；河南省科研服务平台专项资助（2016151)；河南省南水北调中线水源区水生态安全创新型科技团队专项资助（17454）

** 通讯作者，电子邮箱：jianhexu@ecust.edu.cn；kanyunchao@163.com；lunguangyao@163.com

§ 共同第一作者

R-扁桃酸。NAD$^+$依赖型的扁桃酸脱氢酶主要来源于酵母属、乳杆菌属和粪肠球菌属。Yamazaki 等人从粪链球菌 *Streptococus faecalis* IFO 12964 菌株中分离出了一种 R-扁桃酸脱氢酶，其结构为同型二聚体，比酶活为 8.85 U/mg，并对该酶做了一定的应用研究[6]。Hummel 从弯曲乳杆菌 *Lactobacillus curvatus* DSM 20019 菌株中也获得了一个 R-扁桃酸脱氢酶，纯酶的比酶活约为 3 U/mg[7]。Fan 等人从短乳杆菌 *Lactobacillus brevis* 中克隆出了一个 R-扁桃酸脱氢酶，重组酶对 R-扁桃酸的催化活力可以达到 330 U/mg[5, 8]，同时将该酶成功应用于了苯甘氨酸的级联合成[8]。经过众多科研工作者的不懈努力，R-扁桃酸脱氢酶的催化活性得到了显著提高，但是离满足工业生产的实际需求仍有一定的距离。此外，目前已报道的 R-扁桃酸脱氢酶也还缺乏温度稳定性、有机溶剂耐受性等方面的研究。

自然界中蕴藏着丰富的未被发掘的新型酶资源，如何去发掘这些未知的酶类并加以适当的改造以满足工业生产的需求，已渐渐吸引了广大科研工作者的关注[9, 10]。迄今已有 2000 多个微生物基因组信息被测定和公开，而且这些数据仍在不断增长[11]，这些日益丰富的基因组信息为新酶的发掘提供了丰富的资源[12]。基因组挖矿 (Genome mining) 是指开发基因组信息以发现一些新的过程、靶点和产物[13]。基因组挖矿技术可以实现从基因组数据库到真实酶数据库的跨越，进一步丰富了可被利用或改造的酶资源[10, 14]。近年来，已有许多成功利用基因组挖矿技术发现新酶的报道[15, 16]。本研究试图借助基因组挖矿技术从已报道的基因组信息中挖掘新型的 R-扁桃酸脱氢酶，并对其进行表达和鉴定，为后续的理性改造、高水平表达及其在生物合成中的应用奠定坚实的基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1 菌株与质粒　*Escherichia coli* BL21(DE3)菌株和 *E. coli* DH5α/pET28a 由本研究室保藏；*Lactococcus lactis* CICC 20209 和 *Leuconostoc citreum* CICC 23234 购自中国工业微生物菌种保藏中心；*Klebsiella oxytoca* 由浙江大学吴坚平教授馈赠；*Staphylococcus aureus*

由南阳师范学院史鸿飞博士馈赠。

1.1.2 试剂与试剂盒　限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 购自 NEB 公司；PrimeSTAR® HS (Premix)和 DNA Marker 购自 Takara 公司；一站式 His 标记蛋白质微量纯化套装购于北京天恩泽基因科技有限公司，用于重组酶的快速亲和纯化；R-扁桃酸、S-扁桃酸、R-邻氯扁桃酸、S-邻氯扁桃酸、L-乳酸和苯乙酮酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；NAD^+、$NADP^+$、NADH 和 NADPH 购自邦泰生物工程（深圳）有限公司；其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 常用培养基　脱脂牛奶培养基：12%脱脂奶粉，自然 pH 值，113℃灭菌 20 min，用于 *Lactococcus lactis* 的培养；MRS 培养基：1%酪蛋白胨、1%牛肉膏、0.5%酵母粉、0.5%葡萄糖、0.5%乙酸钠、0.2%柠檬酸二铵、0.1% Tween 80、0.2% K_2HPO_4、0.02% $MgSO_4·7H_2O$、0.005%$MnSO_4·H_2O$、2%$CaCO_3$，调节 pH 至 6.8，121℃灭菌 20 min，用于 *Leuconostoc citreum* 的培养；LB 培养基：1%蛋白胨、1%氯化钠和 0.5%酵母提取物，自然 pH 值，121℃灭菌 20 min，用于大肠杆菌的培养。

1.1.4 常用软件　DNAMAN 6.0：简单的序列比对及分析；BioEdit：测序彩图的分析；Oligo 7：引物设计；Geneious 4.7.5：基因或蛋白质序列的存储与管理；Clustal X2：用于多序列比对；MEGA6.0：用于进化树的构建。

1.2　方法

1.2.1 新型扁桃酸脱氢酶的基因挖掘　以研究比较透彻、催化活性较高的短乳杆菌来源的 R-扁桃酸脱氢酶 LbDMDH[8]的蛋白序列为探针进行 BLAST 分析，从查询的结果中找出一系列基因组信息来源的且未经表达鉴定、假定的 2-dehydropantoate 2-reductase。对这些序列进行进化树的构建和分析，然后从每个分支中选取 1~2 个代表性的基因序列进行克隆表达和鉴定。

1.2.2 引物的设计及基因合成　基于上述分析的结果，对于原始菌株容易获得的酶分别设计一对特异性的上下游引物，上下游引物分别加上 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点，引物序列如表 1 所示，并委托苏州泓迅生物科技有限公司进行引物合成；对于原始菌株不易获得的

Lactobacillus pasteurii、*Staphylococcus succinus*、*Clostridium botulinum* 和 *Lactobacillus harbinensis* 菌株来源扁桃酸脱氢酶 LpDMDH (WP_009559388.1)、SsDMDH (WP_073505393.1)、CbDMDH (WP_035784277.1)和 LhDMDH (WP_027828400.1)分别进行密码子优化后委托苏州泓迅生物科技有限公司进行全基因的合成。

表 1　新型 R-扁桃酸脱氢酶基因克隆及表达所需的引物

Table 1　Sequences of the primers used for cloning and expression of novel R-mandelate dehydrogenases

Primer name	Product description	Primer sequence (5’-3’)	Accession number
SeDMDH-F	DMDH from *Salmonella enterica*	CGCGGATCCATGAAAATTGCAATCGCAGG	WP_058112521.1
SeDMDH-R		CCGCTCGAGTTGCGCTTCTTTAGCGTGAA	
LlDMDH1-F	DMDH1 from *Lactococcus lactis*	CGCGGATCCATGAAAATCGCAATAGCAGG	WP_075525716.1
LlDMDH1-R		CCGCTCGAGATGCGCCTCTAAAATTTCTTC	
LlDMDH2-F	DMDH2 from *Lactococcus lactis*	CGCGGATCCATGAGAATCACAATTGCCGGT	WP_011676318.1
LlDMDH2-R		CCGCTCGAGTTTCGCCTTTAATAACTCTT	
SaDMDH-F	DMDH from *Staphylococcus aureus*	CGCGGATCCATGTACAAAATAGCCATAG	WP_031797626.1
SaDMDH-R		CCGCTCGAGTAATTTTGATTCTAATTGGT	
KoDMDH-F	DMDH from *Klebsiella oxytoca*	CGCGGATCCATGAAAATTGCAATCGCAG	WP_004104561.1
KoDMDH-R		CCGCTCGAGTTGCGCTTCTTTTGCGTGAAT	
LcDMDH-F	DMDH from *Leuconostoc citreum*	CGCGGATCCATGAAAATAGCTATTGCAGGA	WP_036058586.1
LcDMDH-R		CCGCTCGAGAATTTCAAAGTTTTCTTGCT	

1.2.3 R-扁桃酸脱氢酶的基因克隆表达及纯化　分别提取 *S. enterica*、*L. lactis*、*S. aureus*、*K. oxytoca* 和 *L. citreum* 基因组 DNA，用对应的引物进行 PCR 扩增对应的目的基因，获得的目的基因及其他全合成的基因分别经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后连接至经同样双酶切的 pET28a 质粒上，转化至 BL21 感受态细胞后分别进行抗性筛选、菌落 PCR 检测及测序鉴定。后续的表达纯化步骤参照马晨露[17]等人的方法稍作修改，本研究中诱导条件采用

终浓度为 0.1 mM IPTG、16℃诱导 20 h，其他条件不变。

1.2.4 酶活性及蛋白分析　参照范长伟等人所述的方法测定扁桃酸脱氢酶的活性[8]。酶活测定的反应体系为 1 mL，包含 1 mM 的 NAD^+（$NADP^+$）、6 mM 的底物(R)-扁桃酸、100 mM 的 pH 9.5 甘氨酸-NaOH 缓冲液，30℃保温 2 min 后加入 100 μL 稀释适当倍数的酶液，测定 1 分钟内 340 nm 下吸光度的变化值。在该条件下，每分钟产生 1 μmol NADH(NADPH)所需的酶量定义为 1 U。酶活：U = EW·V·1000/6220·L=EW/6.22。EW：1 min 下 A340 的变化值，V：反应液的体积（mL），6220：摩尔消光系数（$L*mol^{-1}*cm^{-1}$），L：光程距离（cm）。采用 Bradford 法测定蛋白的浓度，以牛血清白蛋白为参照标准。用 12.5%的分离胶进行 SDS-PAGE 分析，并用 Quantity One 软件计算目的蛋白的表观分子量[18]。

1.2.5 重组酶的温度特性　参照 1.2.4 中的方法，分别在 20~60℃（以 5℃为间隔）下测定各重组酶的催化活性以获得各重组酶的最适反应温度；将各重组酶分别在 20~50℃（以 5℃为间隔）下保温 1 h，然后在各自最适反应温度下测定各自的残留酶活，以冰浴保存 1 h 后的残余酶活为 100%，以此来考察各重组酶的温度稳定性。

1.2.6 重组酶的 pH 特性　参照 1.2.4 中的方法，在各自最适反应温度下，分别在 pH 值 7.0~11（以 0.5 为间隔）下测定各重组酶的催化活性以获得各重组酶的最适反应 pH 值；将各重组酶分别在 pH 值 7.0~11（以 0.5 为间隔）缓冲液中冰浴 1 h，然后在各自最适反应温度和最适反应 pH 下测定各自的残留酶活，以残余酶活最高的值为 100%，以此来考察各重组酶的 pH 稳定性。

1.2.7 重组酶的动力学参数　将辅酶的终浓度定为 1 mM，逐步提高底物的终浓度，测定各酶在不同底物浓度下的反应速率，利用 Origin 9.0 软件进行非线性拟合，得出各酶对底物的 K_m、K_{cat} 和 V_{max} 值；将底物的终浓度定为 10 mM，逐步提高辅酶的终浓度，测定各酶在不同辅酶浓度下的反应速率，利用 Origin 9.0 软件进行非线性拟合，得出各酶对辅酶的 K_m、K_{cat} 和 V_{max} 值。

1.2.8 重组酶的底物谱分析　参照 1.2.4 中的方法分别测定各重组对 S-扁桃酸、R-邻氯扁

桃酸、乳酸的氧化活性，为后续苯乙酮酸的生物合成及辅酶循环奠定理论基础。

2 结果

2.1 R-扁桃酸脱氢酶的基因克隆

利用 1.2.3 中的方法，借助 PCR 技术分别以各基因组 DNA 为模板扩增出了 *LlDMDH1*、*LlDMDH2*、*KoDMDH* 和 *LcDMDH* 共 4 个潜在的扁桃酸脱氢酶基因，结果如图 1 所示，鉴于 PCR 扩增出的产物较为单一，分别利用 PCR 产物回收试剂盒将产物进行了 PCR 产物回收。经过多次尝试，*SeDMDH* 和 *SaDMDH* 的基因未能成功扩增。另外，采用全基因合成的方法获得了 *LpDMDH*、*SsDMDH*、*CbDMDH* 和 *LhDMDH* 另外 4 个潜在的扁桃酸脱氢酶基因。将获得的 8 个基因经双酶切后分别连接至经同样双酶切的 pET28a 质粒，转化 BL21 感受态后经 Kan 抗性筛选后进行菌落 PCR 检测，结果如图 2 所示，选出了 8 个阳性的菌落，将阳性菌落送苏州泓迅生物科技有限公司进行测序，结果显示 8 个基因的序列与 NCBI 上登陆的完全一致。

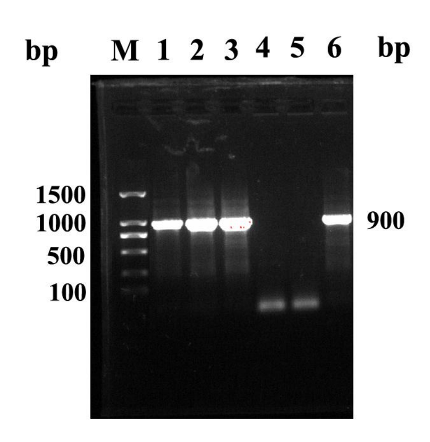


图 1 4 个 R-扁桃酸脱氢酶基因的 PCR 扩增

Fig. 1 The PCR amplification for the four R-mandelate dehydrogenase gene.

M, DNA marker; 1, *LlDMDH1*; 2, *LlDMDH2*; 3, *KoDMDH*; 4, *SeDMDH*; 5, *SaDMDH*; 6, *LcDMDH*.

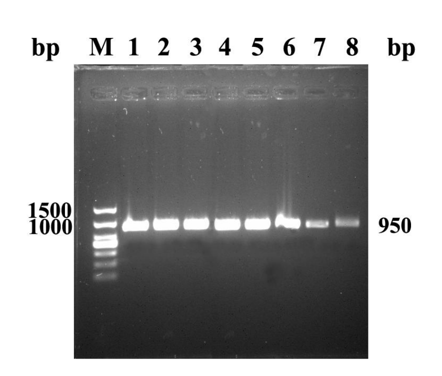


图 2 重组大肠杆菌的菌落 PCR 鉴定

Fig. 2 The bacterial colonies PCR identification for the recombinant *E.coli*.

M, DNA marker; 1, BL21/pET28a-*LlDMDH1*; 2, BL21/pET28a-*LlDMDH2*; 3, BL21/pET28a-*KoDMDH*; 4, BL21/pET28a-*LcDMDH*; 5, BL21/pET28a-*LpDMDH*; 6, BL21/pET28a-*SsDMDH*; 7, BL21/pET28a-*CbDMDH*; 8, BL21/pET28a-*LhDMDH*.

2.2 重组 R-扁桃酸脱氢酶的表达及纯化

分别将上述 8 个携带潜在的扁桃酸脱氢酶基因的基因工程菌进行低温、低浓度 IPTG 的诱导表达，BL21/pET28a 作为阴性对照，BL21/pET28a-*LbDMDH* 作为阳性对照。将 100 mL 发酵液中的菌体离心收集，然后超声破碎，高速离心 30 min 后收集裂解上清，将上清过 0.45 μm 滤膜后用一站式 His 标记蛋白质微量纯化套装进行纯化，并用 10 kDa 截留分子量的超滤离心管进行咪唑的去除和产物的浓缩，最终分别将各重组蛋白定容至 1.5 mL。将裂解上清液和纯化后的产物分别进行 SDS-PAGE 分析，结果显示 8 个潜在的扁桃酸脱氢酶基因在 BL21 中均实现了可溶性表达，利用 Quantity One 软件计算出各目的蛋白的表观分子量约为 38 kDa，4 个有 R-扁桃酸脱氢酶催化活性的代表性蛋白 SDS-PAGE 图谱如图 3 所示。

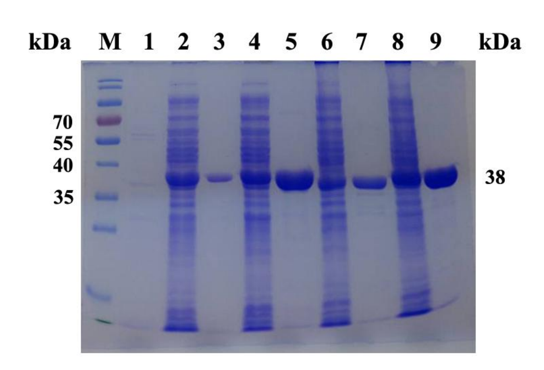


图 3 代表性重组 R-扁桃酸脱氢酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 The SDS-PAGE analysis for the representative recombinant R-mandelate dehydrogenases.

M, PageRuler Prestained Protein Ladder; 1, expressed products of BL21/pET28a; 2, crude LbDMDH; 3, purified LbDMDH; 4, crude LhDMDH; 5, purified LhDMDH; 6, crude LcDMDH; 7, purified LcDMDH; 8, crude LlDMDH-2; 9, purified LlDMDH-2.

各粗酶液的 R-扁桃酸脱氢酶活性测定结果显示，相同测定条件下 LbDMDH、LhDMDH、LcDMDH 和 LlDMDH-2 的表达水平分别为 28.3、233.1、1.4 和 1.1 U/mL 发酵液，其他 5 个基因尽管能够表达，但表达产物均无 R-扁桃酸脱氢酶活性，其中 LhDMDH 的表达水平接近于探针 LbDMDH 的 10 倍。而 LbDMDH、LhDMDH、LcDMDH 和 LlDMDH-2 纯酶的比酶活分别为 340.0、1264.3、40.6 和 11.7 U/mg，LhDMDH 的比酶活也接近于探针的 4 倍。

2.3 重组酶的温度特性

采用 1.2.5 中的方法测定了 4 个重组酶的最适反应温度和温度稳定性，结果分别如图 4 和图 5 所示。LhDMDH 跟探针的最适反应温度一致，均为 30℃，而 LcDMDH 和 LlDMDH-2 的最适反应温度为 25℃。在 20℃下保温 1 h，4 个重组酶均能保留 80%以上的酶活，遗憾的是 LhDMDH 和 LlDMDH-2 在 30℃下保温 1 h 后残留酶活已不足 50%，这会限制它们在苯乙酮酸及其衍生物生物合成中的应用，在后续的研究中必须得对它们的温度稳定性进行相应的改造。

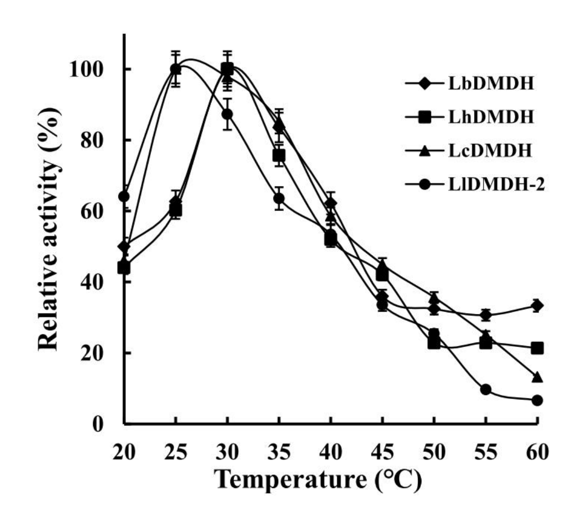


图 4 重组 R-扁桃酸脱氢酶的最适温度

Fig. 4 The temperature optima of recombinant R-mandelate dehydrogenases.

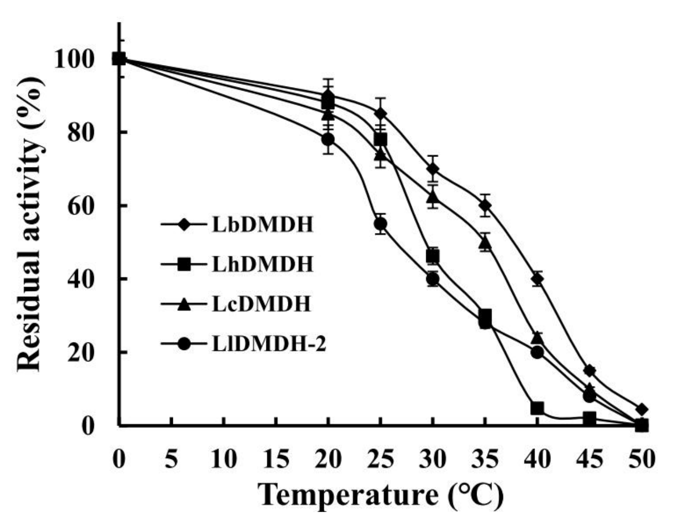


图 5 重组 R-扁桃酸脱氢酶的温度稳定性

Fig. 5 The temperature stability of recombinant R-mandelate dehydrogenases.

2.4 重组酶的 pH 特性

利用 1.2.6 中的方法测定了 4 个重组酶的最适反应 pH 值和 pH 稳定性，结果如图 6 和图 7 所示。结果显示 4 个重组酶均为嗜碱性酶，LlDMDH-2 的最适 pH 值为 9.0，而其他 3 个重组酶的最适 pH 值为 9.5；LbDMDH、LhDMDH 和 LcDMDH 在 pH9.5~10.5 范围内较稳定，在这个范围内冰上保温 1 h 残留酶活均能保持 80%以上，而 LlDMDH-2 的 pH 稳定范围较窄，仅在 pH 9.0 时较稳定，在 8.5 以下或 9.5 以上酶活迅速丧失。

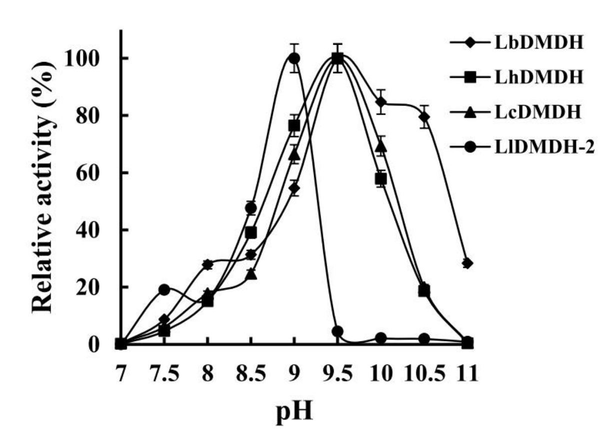


图 6 重组 R-扁桃酸脱氢酶的最适 pH

Fig. 6 The pH optima of recombinant R-mandelate dehydrogenases.

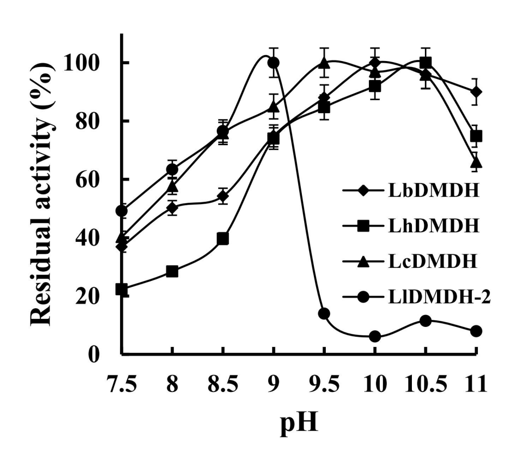


图 7 重组 R-扁桃酸脱氢酶的 pH 稳定性

Fig. 7 The pH stability of recombinant R-mandelate dehydrogenases.

2.5 重组酶的动力学参数

按照 1.2.8 中的方法分别测定了重组酶对 R-扁桃酸和 NAD^+的动力学参数，结果如表 2 和表 3 所示。结果显示，LhDMDH 对 R-扁桃酸的催化常数为 30.82 S^{-1}，催化常数与米氏常数的比值为 28.80 $S^{-1}\cdot mM^{-1}$，明显优于其他 3 个重组酶；此外，过高的 R-扁桃酸浓度对 4 种重组酶的活性均有明显的抑制作用，LbDMDH、LhDMDH、LcDMDH 和 LlDMDH-2 的底物抑制常数分别为 24.37、26.40、24.48 和 16.25 mM。LhDMDH 对辅酶 NAD^+的催化常数与对底物的基本一致，为 29.05 S^{-1}，4 个重组酶对辅酶的米氏常数约为对底物的 1/2。

表 2　R-扁桃酸脱氢酶对 R-扁桃酸的动力学参数

Table 2　The kinetic parameter of R-mandelate dehydrogenases for R-mandelate acid

Enzyme	Kinetic parameter of substrate			
	K_m (mM)	K_{cat} (S^{-1})	K_i (mM)	K_{cat}/K_m (S^{-1} mM^{-1})
LbDMDH	1.45	8.82	24.37	6.08
LhDMDH	1.05	30.28	26.40	28.80
LcDMDH	1.75	1.56	24.86	0.89
LlDMDH-2	1.00	2.29	16.25	2.29

表 3　R-扁桃酸脱氢酶对 NAD^+的动力学参数

Table 3　The kinetic parameter of R-mandelate dehydrogenases for NAD^+

Enzyme	Kinetic parameter of NAD^+			
	K_m (mM)	K_{cat} (S^{-1})	K_i (mM)	K_{cat}/K_m (S^{-1} mM^{-1})
LbDMDH	0.78	9.23	N	11.83
LhDMDH	0.40	29.05	N	72.00
LcDMDH	0.85	1.86	N	2.19
LlDMDH-2	0.42	1.85	N	4.40

2.6 重组酶的底物谱

按照 1.2.8 中的方法研究了 4 个重组酶分别对 R-扁桃酸、R-邻氯扁桃酸、S-扁桃酸、S-邻氯扁桃酸和 L-乳酸的氧化活性，结果如表 4 所示。4 个酶均对 R-扁桃酸有较大的氧化活性，对 R-邻氯扁桃酸的氧化活性极低，因此，若要催化 R-扁桃酸氧化制备邻氯苯乙酮酸，必须得先对这些酶的底物特异性进行适当的改造。另外，这 4 种重组酶对 S-扁桃酸和 L-乳酸均无氧化活性，意味着这些酶可以很好地用于外消旋扁桃酸的拆分，同时可以与 L-乳酸脱氢酶共建辅酶循环体系。

表 4　R-扁桃酸脱氢酶的底物谱

Table 4　The substrate spectrum of R-mandelate dehydrogenases

Substrate	Relative activity (%)			
	LbDMDH	LhDMDH	LcDMDH	LlDMDH-2
R-mandelate acid	100	100	100	100
R-2-chloromandelic acid	0.59	0.28	2.51	0.05
S-mandelate acid	0.04	0.02	0	0
S-2-chloromandelic acid	0	0	0	0
L-lactic acid	0	0	0	0

3　讨论

苯乙酮酸是化学合成过程中重要的合成砌块，开发低成本、高质量生物合成苯乙酮酸的绿色工艺具有重要的研究价值和科学意义。在苯乙酮酸的生物合成过程中，扁桃酸脱氢酶起着重要的作用[3]。挖掘具有高催化活性及稳定性的扁桃酸脱氢酶能够显著降低苯乙酮酸的合成成本。在本研究中，采用基因组挖矿技术从海量的基因组数据库中筛选出了 10 个潜在的扁桃酸脱氢酶基因，通过 PCR 扩增或全基因合成的方法获得了其中 8 个基因片段，并在 BL21 中实现了可溶性的表达。其中，LhDMDH 的比酶活高达 1264.3 U/mg，约为探针的 4 倍，在已报道的天然 R-扁桃酸脱氢酶中处于领先水平。另外，LhDMDH 在表达水平和催化常数等特性方面较探针及其他几个潜在的扁桃酸脱氢酶也更具应用潜力，尽管它的温度稳定性还有待进一步改善。幸运的是，随着各种生物信息学软件的出现，尤其是分子动力学模拟技术日趋成熟[19]，温度稳定性改造也日趋理性化，在下一步的研究工作中我们也将着重对 LhDMDH 的温度稳定性进行分子改造。此外，底物谱分析的结果显示 LhDMDH 对 S-扁桃酸和 L-乳酸没有催化活性，这一特性能够很好地满足外消旋扁桃酸的手性拆分及苯乙酮酸生物合成的需求。理论上，在 L-乳酸脱氢酶的协同下，以丙酮酸钠为辅底物能够实现外消旋扁桃酸手性拆分过程中辅酶 NAD^+的有效循环，这也有待我们下一步的研究。

简而言之，本研究借助基因组挖矿技术获得了 1 个催化性能优良的新型 R-扁桃酸脱氢酶 LhDMDH，并进行了相关酶学特性的研究，为后续的高效表达、理性改造及苯乙酮

酸的生物合成奠定了坚实的基础。此外，本研究的成功开展进一步丰富了基因挖掘技术的成功应用的案例，可以为其他酶的基因挖掘提供可资借鉴的经验。

致谢

感谢江南大学邬敏辰教授为本研究提供技术支持！感谢南阳师范学院青年项目（17359）的基金资助。

参考文献：

[1] 张捷龙, 雷进海. 苯甲酰甲酸的合成与应用 [J]. 浙江化工, 2008(12):13-15.

Zhang JL, Lei JH. Synthesis and Application of Benzoylformic acid. Zhejiang Chemical Industry, 2008(12):13-15.

[2] 戴志宏. 苯甲酰甲酸及其甲酯的合成 [D]: 硕士. 合肥工业大学, 2012.

Dai ZH. Synthesis of benzoylformic acid and its methyl ester. Master degree thesis, Hefei University of Technology, 2012.

[3] 曾侦. 扁桃酸消旋酶和扁桃酸脱氢酶基因的克隆及表达 [D]: 硕士. 南京理工大学, 2009.

Zhen Z. Cloning and expression of mandelate racemase gene and S-mandelate dehydrogenase. Master degree thesis, Nanjing University of Science and Technology, 2009.

[4] Wang J, Feng J, Li W *et al*. Characterization of a novel (R)-mandelate dehydrogenase from Pseudomonas putida NUST506 [J]. J Mol Catal B: Enzym, 2015, 120:23-27.

[5] 范长伟. D-扁桃酸脱氢酶的基因挖掘及在多酶偶联合成 L-苯甘氨酸的应用 [D]: 硕士. 华东理工大学, 2014.

Fan CW. Discovery and application of novel D-mandelate dehydrogenase in multienzymatic synthesis of L-phenylglycine. Master degree thesis, East of China University of Science and Technology, 2014.

[6] Yamazaki Y, Maeda H. Enzymatic Synthesis of Optically Pure (R)-Mandelic Acid and Other 2-Hydroxycarboxylic Acids: Screening for the Enzyme, and Its Purification, Characterization and Use [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1986,

50(10):2621-2631.

[7] Hummel W, Schütte H, Kula M-R. Mandelic acid dehydrogenase from *Lactobacillus curvatus* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 28(4):433-439.

[8] Fan CW, Xu GC, Ma BD et al. A novel D-mandelate dehydrogenase used in three-enzyme cascade reaction for highly efficient synthesis of non-natural chiral amino acids [J]. J Biotechnol, 2015, 195:67-71.

[9] 唐存多，史红玲，蔚晓华等. 新型 GH5 家族β-甘露聚糖酶的基因挖掘及表达鉴定 [J]. 食品科学, 2016(11):90-96.

Tang CD, Shi HL, Yu XH. Gene Mining, Expression and Characterization of Novel GH5 Family β-Mannanases. Food Science, 2016(11):90-96.

[10] 唐存多，史红玲，唐青海等. 生物催化剂发现与改造的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2014(09):113-121.

Tang CD, Shi HL, Tang QH. Rencent trends in discovery and protein engineering of biocatalysts. China Biotechnology, 2014(9):113-121.

[11] Furuya T, Kino K. Genome mining approach for the discovery of novel cytochrome P450 biocatalysts [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 86(4):991-1002.

[12] Gong J-S, Lu Z-M, Li H et al. Metagenomic technology and genome mining: emerging areas for exploring novel nitrilases [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(15):6603-6611.

[13] Tang CD, Shi HL, Tang QH *et al*. Genome mining and motif truncation of glycoside hydrolase family 5 endo-beta-1,4-mannanase encoded by Aspergillus oryzae RIB40 for potential konjac flour hydrolysis or feed additive [J]. Enzyme Microb Technol, 2016, 93-94:99-104.

[14] Xiao Z, Wu M, Grosse S et al. Genome mining for new alpha-amylase and glucoamylase encoding sequences and high level expression of a glucoamylase from Talaromyces stipitatus for potential raw starch hydrolysis [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(1):73-86.

[15] Zhu D, Mukherjee C, Biehl ER et al. Discovery of a mandelonitrile hydrolase from

Bradyrhizobium japonicum USDA110 by rational genome mining [J]. J Biotechnol, 2007, 129(4):645-650.

[16] Barriuso J, Prieto A, Martínez MJ. Fungal genomes mining to discover novel sterol esterases and lipases as catalysts [J]. BMC Genomics 2013, 14:712.

[17] 马晨露，唐存多，史红玲等. 头孢菌素C乙酰化酶的半理性改造及7-ACA的生物合成 [J]. 中国生物工程杂志, 2015(12):65-71.

Ma CL, Tang CD, Shi HL et al. Semi rational modification of cephalosporin C acylase and biosynthesis of 7-ACA. China Biotechnology, 2015(12):65-71.

[18] Hu D, Tang C, Li C *et al*. Stereoselective Hydrolysis of Epoxides by reVrEH3, a Novel Vigna radiata Epoxide Hydrolase with High Enantioselectivity or High and Complementary Regioselectivity [J]. J Agr Food Chem, 2017, 65(45):9861-9870.

[19] Tang CD, Li JF, Wei XH et al. Fusing a Carbohydrate-Binding Module into the *Aspergillus usamii* β-Mannanase to Improve Its Thermostability and Cellulose-Binding Capacity by In Silico Design [J]. Plos One, 2013, 8(5):e64766.

Gene mining, expression and characterization of novel R-mandelate dehydrogenases

TANG Cun-duo[1,2§] SHI Hong-ling[1§] MA Yue[1] DING Peng-ju[1] XU Jian-he[2] KAN Yun-chao[1**] YAO Lun-guang[1**]**

(1 Henan Provincial Engineering Laboratory of Insect Bio-reactor and Henan Key Laboratory of Ecological Security for Water Source Region of Mid-line of South-to-North, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China) (2 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: R-mandelate dehydrogenase plays a key role in the biosynthesis of phenylglyoxylic acid, thus exploiting nove R-mandelate dehydrogenase with higher catalytic activity and stability has significant economic value. In order to obtain the perfect R-mandelate dehydrogenase, a novel R-mandelate dehydrogenase was obtained by genome mining, named as *LhDMDH*, which was from *Lactobacillus harbinensis*. The specific activity of LhDMDH was 1264.3 U/mg, which was near to four times that of the probe and leading in the reported enzyme. Meanwhile, the main enzymatic characterizations of the four recombinant enzymes were researched. Their temperature optima were 25 to 30 ℃, and their pH optima were 9.0 to 9.5. The K_{cat} of LhDMDH is 30.28 S^{-1}, which is obviously higher than the ones of the others. In addtion, the results of substrate spectrum of R-mandelate dehydrogenases indicated that the LhDMDH could have advantages over other enzymes in chiral resolution of racemic mandelic acid and the biosynthesis of phenylglyoxylic acid. This research gained ideal results in genome mining of R-mandelate dehydrogenases, established a solid foundation for further transformation and application, and provided a useful experience for the exploiting of other enzymes.

Keywords: mandelate dehydrogenase genome mining expression enzymatic characterization biocatalysis